УДК: 619:579.252.55:615.28

Сашнина Л.Ю.
(ГБНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии РАСХН)

РАЗВИТИЕ УСТОЙЧИВОСТИ И ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К КОМПЛЕКСНОМУ ПРЕПАРАТУ ДИОКСИГЕН

Ключевые слова: бактерии, чувствительность, устойчивость, антимикробные препараты.

Введение. В последние годы все острее становится проблема массовых желудочно-кишечных и респираторных болезней молодняка сельскохозяйственных животных, вызываемых ассоциацией возбудителей, в том числе антибиотикоустойчивыми бактериями [12,10,13].

В связи с этим для повышения эффективности химиотерапии больных животных разрабатываются комплексные препараты, направленные на расширение спектра действия антибактериальных средств, повышение активности составляющих компонентов за счет их синергизма, предупреждение или снижение развития устойчивости микроорганизмов, борьбу с антибиотикорезистентными возбудителями инфекций [3,9,2,6].

Разработанный ВНИВИПФиТ и НПО «Агрофарм» на основе гентамицина сульфата и диоксидина комплексный препарат диоксиген применяется для лечения респираторных [7] и желудочно-кишечных [1,8] болезней сельскохозяйственных животных.

Учитывая, что резистентность бактериальных возбудителей инфекций является основной причиной, ограничивающей эффективность этиотропной терапии [11,4], целью настоящей работы явилось изучение развития устойчивости и восстановления чувствительности эшерихий, сальмонелл, золотистого стафилококка и пастерелл к комплексному препарату диоксиген.

Методика исследования. В работе использовали референтные штаммы микроорганизмов: Escherichia coli 866, Salmonella cholerae suis, Staphylococcus aureus 209P, Pasteurella multocida B14, комплексный препарат диоксиген и составляющие его компоненты.

Изучение антимикробной активности препаратов проводили методом серийных разведений [5].

Формирование резистентности у микроорганизмов к диоксигену и составляющим его компонентам изучали путем культивирования их в мясо-пептонном бульоне (МПБ), содержащем возрастающие суббактериостатические концентрации препарата. После каждых десяти пассажей определяли антимикробную активность антимикробных препаратов в отношении указанных микроорганизмов.

У пассируемых культур степень устойчивости к препаратам оценивали по коэффициенту резистентности – отношению максимальной, не препятствующей росту бактерий концентрации, к исходной.

Для изучения стабильности приобретенной бактериями устойчивости и восстановления их чувствительности к диоксигену проводили последовательные пассажи их в МПБ, не содержащем препарат. После каждых десяти пассажей у бактерий изучали культурально-морфологические и биохимические свойства и чувствительность к препарату.

Результаты исследования. Все взятые в опыт микроорганизмы обладали типичными для своего вида морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами.

Предварительно проведено изучение антимикробной активности компонентов комплексного препарата диоксидина и гентамицина сульфата и развития к ним устойчивости эшерихий, сальмонелл, золотистого стафилококка и пастерелл (табл.1), результаты которого использованы для оценки обоснованности включения их в качестве основы при разработке диоксигена.

Минимальная бактериостатическая концентрация (МБсК) диоксидина составила для Escherichia coli 866, Salmonella cholerae suis и Pasteurella multocida B14 12,5 мкг/мл, Staphylococcus aureus 209 P – 25,0 мкг/мл, гентамицина – соответственно 3,12 и 0,78 мкг/мл.

МБсК диоксидина в отношении эшери-

Таблица 1

Антимикробная активность диоксидина и гентамицина и повышение устойчивости к ним бактерий.

Препараты	Кол-во пассажей	Виды микроорганизмов			
		E. coli 866	S. cholerae suis	Staph. aureus 209P	P. multocida B 14
Диоксидин		МБсК, мкг/мл	МБсК, мкг/мл	МБсК, мкг/мл	МБсК, мкг/мл
	Исх.	12,5	12,5	25,0	12,5
	10	25,0	25,0	25,0	12,5
	20	50,0	50,0	50,0	12,5
	30	100,0	50,0	100,0	25,0
	40	100,0	100,0	200,0	50,0
	50	200,0	100,0	200,0	50,0
	60	200,0	100,0	200,0	50,0
Гентамицин	Исх.	3,12	3,12	0,78	3,12
	10	6,25	6,25	3,12	6,25
	20	25,0	6,25	6,25	6,25
	30	25,0	25,0	25,0	25,0
	40	100,0	50,0	50,0	25,0
	50	200,0	200,0	100,0	25,0
	60	200,0	200,0	100,0	25,0

Примечание: минимальные бактерицидные концентрации препаратов для всех микроорганизмов во все сроки исследования превышали бактериостатические в 2 раза.

хий через 10 пассажей увеличилась в 2 раза (25,0 мкг/мл), после 20 - в 4 (50,0 мкг/мл), через 30 и 50 пассажей в 8 (100,0 мкг/мл) и 16 (200,0 мкг/мл) раз соответственно. В дальнейшем минимальная бактериостатическая концентрация препарата в отношении эшерихий не повышалась.

Минимальная ингибирующая концентрация препарата для сальмонелл после 10 пассажей увеличилась в 2 раза (25,0 мкг/мл), через 20 - в 4 (50,0 мкг/мл) и 40 пассажей в 8 (100,0 мкг/мл) раз.

Минимальная бактериостатическая концентрация диоксидина в отношении стафилококка через 20 пассажей увеличилась в 2 раза (50,0 мкг/мл), после 30 - в 4 (100,0 мкг/мл) и 40 пассажей - в 8 (200,0 мкг/мл) раз.

МБсК препарата в отношении пастерелл повышалась в 2 раза только через 30 (25,0 мкг/мл) и в 4 раза после 40 пассажей (50,0 мкг/мл).

При дальнейших пассажах не происходило повышение МБсК диоксидина в отношении сальмонелл, золотистого стафилококка и пастерелл.

МБсК гентамицина сульфата в отношении эшерихий после 10 пассажей увеличилась в 2 раза (6,25 мкг/мл), 20 - в 8 (25,0 мкг/мл), через 40 и 50 пассажей - в 32 (100,0 мкг/мл) и 64 (200,0 мкг/мл) раза соответственно.

Минимальная ингибирующая концентрация гентамицина сульфата в отношении сальмонелл после 10 пассажей увеличилась в 2 раза (6,25 мкг/мл), 30 - в 8 (25,0 мкг/мл), 40 - в 16 (50,0 мкг/мл) и 50 пассажей в 64 (200,0 мкг/мл) раз.

МБсК препарата для стафилококка после 10 пассажей увеличилась в 4 раза

(3,12 мкг/мл), через 20 - в 8 (6,25 мкг/мл), 30 - в 32 (25,0 мкг/мл), 40 и 50 пассажей - в 64 (50,0 мкг/мл) и 128 (100,0 мкг/мл) раз соответственно.

В отношении пастерелл минимальная бактериостатическая концентрация гентамицина сульфата после 10 пассажей увеличилась в 2 раза (6,25 мкг/мл) и через 30 – в 8 раз (25,0 мкг/мл).

Основным механизмом развития устойчивости к гентамицину является образование специфических ферментов, инактивирующих антибиотик. В результате ферментативной инактивации модифицированный антибиотик теряет способность связываться с рибосомами и подавлять синтез белка.

Устойчивость к диоксидину развивается медленно. Установлено, что цитотоксическое действие препарата опосредуется воздействием на участки генома, ответственные за синтез экзоферментов, обусловливающих вирулентность, с чем связана важная способность диоксидина препятствовать развитию резистентности у микроорганизмов.

При изучении антимикробной активности диоксигена установлено, что его исходная минимальная бактериостатическая концентрация для Escherichia coli 866, Salmonella cholerae suis и Pasteurella multocida B14 составила 3,12 мкг/мл, Staphylococcus aureus 209 P - 0,39 мкг/мл (табл.2).

Таблица 2

Антимикробная активность диоксигена и повышение устойчивости к нему бактерий.

Виды микроорганизмов	МБсК, мкг/мл					
	Исх.	10п.	20п.	30п.	40п.	50п.
E. coli 866	3,12	6,25	6,25	25,0	50,0	50,0
S. cholerae suis	3,12	6,25	6,25	25,0	50,0	50,0
Staph. aureus 209P	0,39	0,78	0,78	6,25	12,5	12,5
P. multocida B 14	3,12	3,12	3,12	12,5	12,5	12,5

Примечание: минимальные бактерицидные концентрации препарата в отношении бактерий в 2 раза превышали МБсК.

Из таблицы 2 видно, что диоксиген обладает выраженным антибактериальным действием, не уступая по активности гентамицину в отношении эшерихий, сальмонелл, пастерелл и в 2 раза превышая его в отношении стафилококков. Антимикробная активность комплексного препарата по сравнению с таковой у диоксидина была выше в 4 раза для эшерихий, сальмонелл и пастерелл и в 64 раза – для стафилококков.

При изучении формирования устойчивости бактерий к диоксигену установлено, что МБсК препарата в отношении эшерихий и сальмонелл через 10 пассажей увеличилась в 2 раза (6,25 мкг/мл), после 30 - в 8 (25,0 мкг/мл) и через 40 пассажей – в 16 (50,0 мкг/мл) раз. Для стафилококка минимальная ингибирующая концентрация препарата после 10 пассажей увеличилась в 2 раза (0,78мкг/мл), 30 - в 16 (6,25 мкг/мл) и через 40 пассажей в 32 (12,5 мкг/мл) раз. При последующих пассажах антимикробная активность диоксигена не изменялась.

МБсК препарата в отношении пастерелл увеличилась в 4 раза (12,5 мкг/мл) после 30 пассажей.

Морфологические и биохимические свойства эшерихий, сальмонелл, стафилококков и пастерелл со сформировавшейся резистентностью к диоксигену не отличались от таковых исходных культур указанных микроорганизмов.

Проведенные исследования показали, что развитие устойчивости к комплексному препарату диоксиген у микроорганизмов происходит медленно и не достигает высокого уровня. Коэффициент их резистентности к диоксигену по сравнению с таковым к гентамицину был ниже для пастерелл в 2, а у эшерихий, стафилококков и сальмонелл в 4 раза. По сравнению с аналогичным показателем у бактерий к диоксидину он был выше в 2 раза у сальмонелл, в 4 раза у стафилококков и одинаковым у эшерихий и пастерелл.

При изучении стабильности приобретенной бактериями устойчивости и восстановления их чувствительности к диоксигену были проведены последовательные пассажи микроорганизмов в МПБ, не содержащем препарат. Минимальные бактериостатические концентрации препарата в

отношении бактерий с приобретенной резистентностью составили для Escherichia coli 866 и Salmonella cholerae suis –50,0 мкг/мл, Staphylococcus aureus 209P и Pasteurella multocida B14 –12,5 мкг/мл (табл.3).

Минимальная бактериостатическая концентрация диоксигена в отношении эшерихий снижалась после 40 пассажей в 2 раза (25,0 мкг/мл), 60 - в 4 (12,5 мкг/мл), через 70 и 80 пассажей в 8 (6,25 мкг/мл) и 16 (3,12мкг/мл) раз соответственно и достигла исходного уровня.

Таблица 3.

Антимикробная активность диоксигена в отношении бактерий с приобретенной устойчивостью и восстановление их чувствительности к препарату.

Препарат	Виды микроорганизмов				
	Кол-во пассажей	E. coli 866	S. cholerae suis	Staph. aureus 209P	P. multocida B 14
Диоксиген		МБсК, мкг/мл	МБсК, мкг/мл	МБсК, мкг/мл	МБсК, мкг/мл
	0	50,0	50,0	12,5	12,5
	10	50,0	50,0	12,5	12,5
	20	50,0	50,0	12,5	12,5
	30	50,0	50,0	6,25	12,5
	40	25,0	25,0	0,78	6,25
	50	25,0	25,0	0,39	6,25
	60	12,5	6,25	0,39	3,12
	70	6,25	6,25	0,39	3,12
	80	3,12	3,12	0,39	3,12

Примечание: минимальные бактерицидные концентрации в отношении всех бактерий во все сроки исследований в 2 раза превышали МБсК.

Минимальная ингибирующая концентрация препарата для сальмонелл снижалась после 40 пассажей в 2 раза (25,0 мкг/мл), 60 - в 8 (6,25 мкг/мл) и через 80 пассажей в 16 (3,12 мкг/мл) раз, достигнув начального значения.

МБсК диоксигена в отношении стафилококков через 30 пассажей снизилась в 2 раза (6,25 мкг/мл), 40 - в 16 (0,78 мкг/мл), через 50 пассажей в 32 раза и достигла исходной величины 0,39 мкг/мл.

В отношении пастерелл минимальная ингибирующая концентрация препарата снизилась после 40 пассажей в 2 (6,25 мкг/мл) и через 60 пассажей в 2 (3,12 мкг/мл) раза, достигнув исходного уровня.

Установлено, что приобретенная микроорганизмами устойчивость к диоксигену является нестабильным признаком и восстановление их чувствительности к препарату происходит относительно быстро.

Проведенные исследования показали, что сочетание диоксидина и гентамицина в комплексном препарате повышает его антимикробную активность за счет синергидного эффекта, действуя на разные структуры микробной клетки. Гентамицин связывается с белками специфических рецепторов активного центра присоединения тРНК на субъединице 30S бактериальных рибосом и нарушает образование комплекса между информационной РНК, транспортной РНК и субъединицей 30S, которое сопровождается образованием неполноценных белков, расщеплением полирибосом, нарушением синтеза белка микробной клетки. Диоксидин ингибирует синтез ДНК микробной клетки, снижает активность внеклеточной нуклеазы и плазмокоагулазы у микроорганизмов, что приводит к глубоким нарушениям структуры нуклеоида и функции генетического аппарата микробной клетки. Под действием диоксигена снижается коэффициент устойчивости пастерелл, эшерихий, золотистого стафилококка и сальмонелл по сравнению с таковым к гентамицину за счет включения в комплексный препарат диоксидина.

Резюме: Комплексный препарат диоксиген обладает высокой антимикробной активностью в отношении эшерихий, сальмонелл, золотистого стафилококка и пастерелл. Развитие устойчивости бактерий к препарату происходит медленно и не достигает высокого уровня. Приобретенная микроорганизмами резистентность к диоксигену является нестабильным признаком и восстановление их чувствительности к препарату происходит относительно быстро.

SUMMARY

The composite drug dioxygen has high antimicrobial activity against Escherichia, Salmonella, Staphylococcus aureus and Pasteurella. The development of bacterial resistance to the drug is slow and does not reach a high level. Acquired resistance of microorganisms to dioxygen is an unstable feature and restoration of their sensitivity to the drug is relatively fast.

Keywords: bacteria, sensitivity, stability, antibiotic preparations.

Литература

1.Бригадиров Ю.Н. Лечебная эффективность диоксигена при колибактериозе и сальмонеллезе телят/ Бригадиров Ю.Н., Иванов М.А.//Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях. Международная научно-практическая конференция. Воронеж, 17-19 сентября 2008 года / Материалы конференции. – Воронеж: изд-во «Истоки», 2008.- С.49-51.

2.Гоби Л. Комбинирование антибиотиков /Л. Гоби // Животноводство России – 2009 - №12 – С.32-33.

3.Данилевская Н.В. Особенности применения антибиотиков в ветеринарной практике / Н.В. Данилевская // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2010 - №3(7) – С.37-41.

4.Козлов Р.С. Современные тенденции антибиотикорезистентности возбудителей нозокомиальных инфекций в ОРИТ России: что нас ждет дальше? / Р.С. Козлов, О.У. Стецюк, И.В.Андреева // Интенсивная терапия – 2007 - №4 – С.

5.Лагуткин Н.А. Методические указания по отбору, испытаниям и оценке антивирусных и антибактериальных химиопрепаратов среди соединений различных химических классов/ Н.А. Лагуткин, Ю.О.Селянинов, М.М. Зубаиров, И.Ю.Егорова, В.М. Котляров, В.М. Балышев //Новые методы исследований по проблемам ветеринарной медицины.- Москва, 2008.- Ч.IV.- С.465-488.

6. Лагуткин Н.А. Химиотерапия при инфекционных болезнях / Н.А. Лагуткин // Ветеринария. – 2006.- №2 – С.24 -28.

7.Патент №2367414 Российская Федерация. Способ лечения респираторных болезней молодняка сельскохозяйственных животных/ Шабунин С.В., Востроилова Г.А., Ческидова Л.В., Шахов А.Г., Бригадиров Ю.Н., Сашнина Л.Ю., Михайлов А.А., Лаврищев П.Е., Иванов М.А.; заявитель и патентообладатель ГНУ ВНИВИПФиТ Россельхозакадемии.- №2008120097/ 13 заяв.20.05.2008; опубл.20.09.2009; Бюл.№26.

8.Патент №2351343 Российская Федерация. Способ лечения сальмонеллеза у молодняка сельскохозяйственных животных/ Шабунин С.В., Востроилова Г.А., Ческидова Л.В., Шахов А.Г., Бригадиров Ю.Н., Сашнина Л.Ю., Михайлов А.А., Лаврищев П.Е.; заявитель и патентообладатель ГНУ ВНИВИПФиТ Россельхозакадемии.- №2007139651/13, заяв.25.10.2007; опубл.10.04.2009; Бюл.№10.

9. Ролинсон Г.Н. Связывание антибиотиков с белками // Г.Н. Ролинсон //Антибиотики .- 1971- Т.16.- №16.- №9 – С.3.

10. Русалеев В.С. Бактериальные инфекции животных /В.С. Русалеев// Труды Федерального центра охраны здоровья животных. Материалы междунар. науч. конференции « Инфекционная патология животных», посвященной 50-летию ФГУ «ВНИИЗЖ»./ ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГУ «ВНИИЗЖ»).- Т.VI. – Владимир: Издательство ООО «Транзит-ИКС», 2008.- С.113-120.

11.Семенов В.М. Микробиологические и биологические аспекты резистентности к антимикробным препаратам / В.М. Семенов, Т.И. Дмитраченко, И.В. Жильцов// Медицинские новости – 2004.-№ 2- С.10-17.

12. Шахов А.Г. Этиология и профилактика желудочно-кишечных и респираторных болезней телят и поросят / А.Г. Шахов // Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях. Международная научно-практическая конференция. Воронеж, 23-25 сентября 2002г. Материалы конференции.- Воронеж: ВГУ, 2002.- С. 3-8.

13. Шевцов А.А. Экономически значимые болезни свиней бактериальной этиологии, методы их диагностики и средства профилактики/ Шевцов А.А., Русалеев В.С., Ширяев Ф.А., Потехин А.В.// Промышленное и племенное свиноводство.-2008.-№4.-С.31-35.

14. Терехов В.И., Иванов А.В. Видовой состав бактерий, выделенных от поросят при острых кишечных заболеваниях. – Краснодар. – Ветеринария Кубани, № 3, 2011. – с. 23-25.

Контактная информации об авторах для переписки

Сашнина Лариса Юрьевна, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник отдела микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии РАСХН» Россельхозакадемии. 394087, г. Воронеж, ул. Ломоносова 114/б, тел.: (473)253-92-81.

E-mail.vnivipat@. mail ru